

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 60-236057

(43)Date of publication of application : 22.11.1985

(51)Int.Cl.

G01N 27/26

B01D 57/02

(21)Application number : 59-090957

(71)Applicant : HITACHI LTD

(22)Date of filing : 09.05.1984

(72)Inventor : ITO MICHIO

ISHIKAWA KIYOSHI

YOSHIDA MOTOKO

OKANO KAZUNOBU

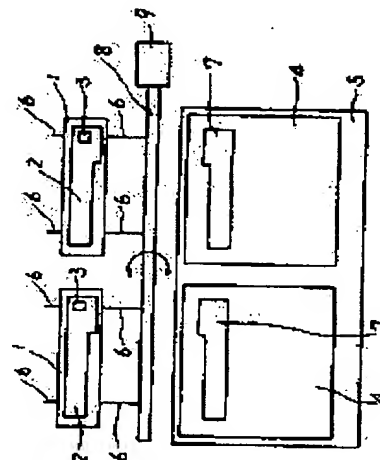
(54) TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS DEVICE

(57)Abstract:

PURPOSE: To simplify an operation in the stage of making two-dimensional development by incorporating a one-dimensional gel by rotating motion into a groove provided in a two-dimensional gel and uniting both to one body.

CONSTITUTION: A glass plate 1 having a small width is subjected to a silane coupling treatment and a thin layer of a polymer gel 2 consisting of acrylamide is coupled thereto. Such plate is fixed onto a supporting bar 6 and is placed horizontally. Serum which is a sample is injected into the sample hole 3 on the gel. A voltage is impressed to both right and left ends of the gel and electrophoresis is executed so that protein is separated.

On the other hand, the concn. gradient gel to be used for the two-dimensions is similarly formed on a glass substrate 5 and a groove 7 for embedding the one-dimensional gel into the gel is provided at the low concn. end of the gel. The one-dimensional gel is transferred into the groove 7 by rotating a driving device 9 around a revolving shaft 8 to turn upward the glass substrate 1 right after the end of the electrophoresis. The space between the one-dimensional gel 2 and the groove 7 is united to one body by low melting agarose and thereafter the voltage is impressed to the gel in the concn. gradient direction, by which the electrophoresis is executed.



⑫ 公開特許公報(A)

昭60-236057

⑪ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和60年(1985)11月22日

G 01 N 27/26

C-7363-2G

B 01 D 57/02

8516-4D

審査請求 未請求 発明の数 1 (全3頁)

⑭ 発明の名称 二次元電気泳動装置

⑮ 特 願 昭59-90957

⑯ 出 願 昭59(1984)5月9日

⑰ 発 明 者 伊 藤 迪 夫 国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

⑱ 発 明 者 石 川 潔 国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

⑲ 発 明 者 吉 田 基 子 国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

⑳ 発 明 者 岡 野 和 宣 国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

㉑ 出 願 人 株式会社日立製作所 東京都千代田区神田駿河台4丁目6番地

㉒ 代 理 人 弁理士 高橋 明夫 外1名

明 細 書

発明の名称 二次元電気泳動装置

特許請求の範囲

1. 回転軸に固定した支持台、該支持台上に配置された一次元目の電気泳動用支持体、他の支持台上に配置された二次元目の電気泳動用支持体よりなり、上記回転軸を回転せしめた際、上記一次元目の電気泳動用支持体が上記二次元目の電気泳動用支持体上又は支持体中の所定の位置に到達するように両者を配置したことを特徴とする二次元電気泳動装置。
2. 一次元目の電気泳動用支持体の断面が台形であり、二次元目の電気泳動用支持体上の所定の位置にその断面が逆台形である溝を有することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の二次元電気泳動装置。

発明の詳細な説明

〔発明の利用分野〕

本発明は臨床検査及びバイオテクノロジー分野における蛋白質の分析法に用いる二次元電気泳動

装置に係わり、特に諸種蛋白質の多成分同時分析法に用いる二次元電気泳動装置に関する。

〔発明の背景〕

従来、蛋白質の多成分同時分析法として用いられているポリアクリルアミドゲルなどを支持体とする二次元電気泳動分析法（詳細は例えば「蛋白質・核酸・酵素」、共立出版、1978年9月号211頁参照）においては、まず、両性電解質を含む細長い円筒状のゲルをガラス管内に作成し、ゲル管を垂直に立て、ゲルの両端に電圧をかけ、ゲルの一端に添加した試料中の成分蛋白質をその等電点の差により分離する（一次元目の分離）、次に、別に、2枚のガラス板の間（ゲル保持用枠内）に作成しておいたアクリルアミドの濃度勾配を有する平板状のゲルの低濃度端に、一次元目の分離を終了した円筒状のゲルをガラス管から押し出して乗せ、ゲル板を垂直に立て、改めて平板ゲルの濃度勾配方向に通電して二次元目の分子重量による分離を行なう。次に、各分離蛋白質を定量するために、平板ゲルをはさんでいるガラス板2

枚をはずし、例えば、コーマツシーブルーなどの染料溶液にゲルを浸し蛋白質を染色しさらにバックグラウンドの脱染色をし、残存している染色蛋白質スポットの吸光度を測定する。

しかしながら、一次元目に用いる細長いゲルは柔らかく、ガラス管から押し出し、平板ゲルの一端にすきまなく密着させる操作も機械的方法により行なうことは困難である。又、二次元泳動後の柔らかい平板ゲルをガラス板の間から取り出し、染色、脱染色、吸光度測定など一連の操作中取扱うのも、ゲルの破損などの問題があり困難である。

〔発明の目的〕

本発明の目的は上記二次元電気泳動法のもつ優れた分離性能は損わず、且つ従来法のもつ欠点を改良した二次元電気泳動装置を提供することにある。

〔発明の概要〕

本発明は一次元目と二次元目の電気泳動分離に用いる支持体（アクリルアミドゲル、アガロースゲルなど）の片面を機械的強度のある基板（ガラ

(3)

シプロピル基、グリシドオキシプロピル基などの有機残基、Xはエトキシ、メトキシ、アセトキシなどに代表される有機残基からなる化合物）で表面処理して基板上の水酸基とX基の間で脱水縮合を起させる。他方Rとアクリルアミド不飽和二重結合との間で結合が起ることによりアクリルアミドが基板に固定化される。

二次元泳動用支持体である片面固定の濃度勾配平板ゲルの作成は以下の手順で行なう。たとえば11mm角の基板をスペーサを介してシランカップリング処理面、未処理面を交互に向かい合わせ組合わせた形で平板ゲル製造用の容器内に垂直に挿入する。これにあらかじめ組まれたプログラムに従って連続的に濃度変化をつけたアクリルアミドモノマー、架橋剤、そして重合触媒の混合溶液を注入して濃度勾配を形成させたのち触媒作用により重合させポリマーゲルとする。スペーサとプログラムを変えることにより任意の厚さ、任意の濃度勾配を有する片面固定平板ゲルが得られる。尚基板上部のアクリルアミド低濃度位置に一次元ゲル

(5)

ス、ポリエステルなど）に結合、固定化して用いるものであり、二次元展開させる際に一次元ゲルを二次元ゲル内に設けた溝に回転運動により組みこみ、さらに両者を一体化するため、隙間に溶液状のアガロースなどを流しこんで固化して用いることのできる装置である。この装置により、一、二次元移行がスムーズに行なわれるため、分離性能も損わず操作性及び再現性の優れた結果が得られる。

一、二次元泳動用支持体について以下に説明を加える。

一次元支持体の構造はシランカップリング処理した巾の細い基板（たとえばガラス、ポリエステル基板）にアクリルアミドのポリマーゲルの片面を結合し、他の片面は開放状態になっている。ゲルを固定する基板は表面を清浄に保つたのちアルカリ処理（たとえば6N-NaOH溶液中に浸漬、水洗、乾燥）で表面を活性化したのち、これをシランカップリング剤（ $R-SiX_3$ 、Rはたとえばビニル基、メルカプトプロピル基、メタクリルオキ

(4)

埋め込み用の溝を作成するための鋳型を設けておく。

〔発明の実施例〕

以下、本発明の実施例を第1図により説明する。実施例1。

細巾のガラス板第1図1をメタクリルオキシプロピルトリメトキシシランで処理したのち、この中央部にアクリルアミドポリマーゲル2（組成アクリルアミドモノマー3.8%、NN'メチレンビスアクリルアミド0.2%、テトラメチルエチレンジアミン0.028%、過硫酸アンモニウム0.07%、両性担体、たとえばLKB社製アンフオラインPH3.5~9.5、2%）の薄層を結合させる。これを支持棒6の上に固定し水平に置き血清3μlをゲル上のサンプル孔（第1図の3）に注入する。ゲルの左右両端はそれぞれ0.01Mリン酸（陽極）と0.04M水酸化ナトリウム溶液（陰極）に濾紙で接続させ、300Vで4時間電気泳動して等電点差による蛋白質の分離を行なう。

(6)

他方二次元目に用いる濃度勾配ゲル(4~17%, 第1図4)も同様にシランカプリング処理をしたガラス基板5(110×230×1mm)に結合させ、その中に一次元ゲル埋め込み用の溝7をゲルの低濃度端に設けておく。二次元目の電気泳動は基板5を冷却板上に水平にのせ、ゲルの濃度勾配方向の両端をトリス・グリシン緩衝液(PH 8.6)に濾紙を経由して液絡させる。一次元ゲルは泳動終了後直ちに、駆動装置9を矢印のように動作し、回転軸8のまわりに180度回転させ、ガラス基板1を上にして溝7に移行させる。一次元ゲル2と溝7の間隙は低融点アガロースによりうめて両者を一体化させたのち、200Vで3時間泳動を行ない分子量分離を行なう。二次元目の電気泳動終了後ゲル4は基板5ごとコーマツシブルー-R250染色液(メタノール50%, 酢酸7%を含む)で染色したのち、バックグラウンドの脱染を7%酢酸水溶液中で行なう。以上の操作で100種類位の蛋白質の分離スポット像が得られる。

(7)

数の試料を再現性良く分析することが可能になった。本発明は二次元電気泳動法の自動化に有効である。

図面の簡単な説明

第1図は本発明における二次元泳動装置の平面図、第2、第3図は同装置の断面図である。
1…一次元泳動用ゲルの基板、2…一次元泳動用ゲル、3…試料添加用孔、4…二次元泳動用ゲル、5…二次元泳動用ゲルの基板、6…支持棒、7…一次元泳動用ゲルを入れる溝、8…回転軸、9…回転運動駆動装置。

代理人 井理士 高橋明

本実施例では2枚の泳動像を同時に作る装置について記述したが、勿論、回転軸8に、多数の一次元ゲルを固定しておけば多数の泳動分離像を同時に手間を省いて再現的に作ることができる。

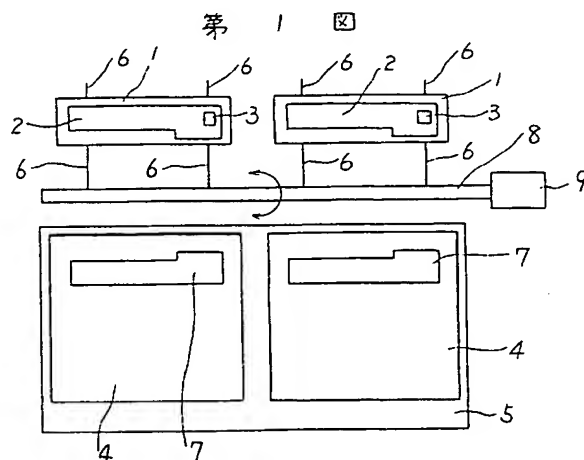
第1図において、支持棒6及び回転軸8は電気泳動電流の短絡を防ぐため絶縁性の材料で作成することが望ましい。

なお、第3図2に示すごとく、一次元泳動用ゲルとして、その断面を台形に成型したものをを用い、このゲルを受け入れる二次元目のゲル上の溝7の断面を逆台形状に成型しておけば、二つのゲルのはめ合いが正確に行なわれ、より良い結果が得られる。

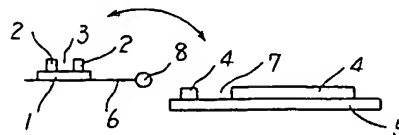
【発明の効果】

本発明の装置を用いれば一次元目と二次元目の各々機械的強度の低いゲル状の泳動用支持体を直接取扱う必要がなくなり、固い基板ごと取扱えるため操作が簡略化される。特に、一次元目のゲルの二次元目ゲルへの移行を人手を介さずもつとも簡単な回転運動により行なうことができるため多

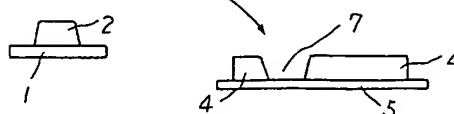
(8)



第2図



第3図



(9)